

## ***Bradyrhizobium* sp. LmjC necesita un sistema de secreción tipo III para nodular eficientemente al altramuz valenciano (*Lupinus mariae-josephae*)**

López, Carla; Pastor, Víctor; Duran, David

Tutor: Rey, Luis.

Departamento de Biotecnología, E.T.S. I. Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid  
Correo electrónico: [\\_carla.lopeza@alumnos.upm.es](mailto:_carla.lopeza@alumnos.upm.es)

### **RESUMEN**

La mayoría de las leguminosas establecen una simbiosis con bacterias denominadas rizobios que fijan dinitrógeno en estructuras especializadas llamadas nódulos a cambio de fotosintatos. Existen varios elementos que hacen esta interacción específica y efectiva, entre ellos se encuentra la presencia, en algunos rizobios, de estructuras tubulares que introducen proteínas de la bacteria (efectores) en el citoplasma de células vegetales. En nuestro estudio de la interacción de la bacteria designada como *Bradyrhizobium* sp. LmjC con el altramuz valenciano *L. mariae-josephae* Pascual, hemos demostrado que existe uno de esos sistemas de secreción de tipo III y que éste es esencial para una simbiosis eficiente. Además hemos iniciado la caracterización de un posible efector denominado NopE y por último estamos estudiando otros rasgos fenotípicos de dicha bacteria como su resistencia a antibióticos, su crecimiento con distintas fuentes de carbono, su tiempo de generación y otras pruebas bioquímicas como la actividad ureasa.

**Palabras clave:** *Efector, Bradyrhizobium, Sistema de secreción, Simbiosis, Lupinus*

### **INTRODUCCIÓN**

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es de gran relevancia para la Agricultura. La interacción entre la bacteria y la leguminosa es muy específica y entre los elementos que la determinan se encuentra el tipo de exopolisacáridos que presenta la bacteria, el tipo de señal bacteriana (Factor Nod) que reconoce la leguminosa y recientemente se ha destacado el papel de sistemas de secreción presentes en algunos rizobios. Los sistemas de secreción actúan como jeringas inyectando proteínas bacterianas denominadas efectores, al citoplasma vegetal. El sistema mejor conocido en rizobios se denomina sistema de secreción de tipo III (T3SS). En nuestro grupo se estudia la simbiosis de *Lupinus mariae-josephae*, un altramuz endémico de Valencia, único por preferir suelos alcalinos y sus endosimbiontes denominados *Bradyrhizobium* sp Lmj, (Duran et al 2013). Uno de estos rizobios, LmjC ha sido secuenciado en nuestro grupo y presenta un T3SS cuyo papel en la simbiosis es el principal objeto de este trabajo.

### **MATERIAL Y METODOS**

**Crecimiento de plantas y microorganismos.** Las semillas de *L. mariae-josephae* Pascual se desinfectaron con lejía al 25% tras incubarse un minuto en etanol y luego se les realizó un corte en la cubierta para que germinaran. Posteriormente se crecieron en invernadero en solución Leonard y en condiciones bacteriológicamente controladas. Los cultivos microbianos se incubaron a 28°C en medio YMB o AG, donde se determinaron los tiempos de generación, resistencia a antibióticos y crecimiento con distintas fuentes de carbono (en su caso se cambió la fuente de carbono del YMB o AG por la que se quería probar)

**Construcción del mutante *ftsI*.** Se amplificó una región interna del gen que se clonó primero en el vector pCR2.1-TOPO y posteriormente en el vector pK18mobSac. La mutación se incorporó al genoma mediante recombinación (Schäfer et al., 1994) y pudo seleccionarse porque el mutante incorporó un gen de resistencia a kanamicina.

**Purificación y autoescisión de la proteína NopE.** Mediante PCR con oligonucleótidos especialmente diseñados se amplificó una variación del gen *nopE* capaz de codificar una



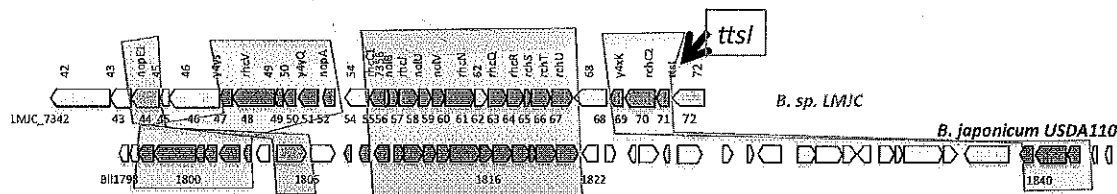
extensión peptídica (Streptag) en el extremo C-t. Este gen se clonó en el vector pT7-7. Con dicho vector se transformó *E. coli* donde se indujo la expresión de la proteína en presencia de IPTG. La proteína expresada con la cola Strep se purificó por cromatografía de afinidad (columna de Streptactina).

Se hicieron incubaciones de la proteína purificada en presencia de diferentes cationes y la autoescisión se examinó en geles SDS-PAGE.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

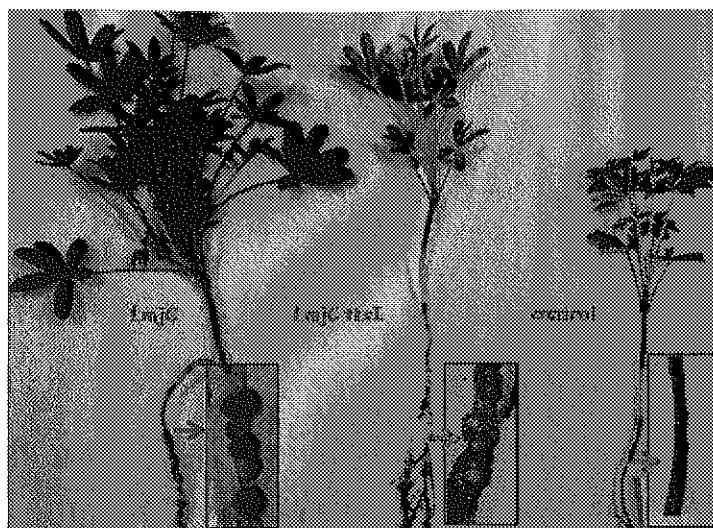
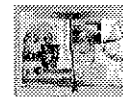
La presencia de un T3SS en la cepa LmjC se evidenció tras un análisis de tipo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que permitió alinear una parte del genoma de LmjC con la agrupación génica que codifica para un T3SS en *B. japonicum* USDA110, ver Figura 1. El T3SS de LmjC presenta 33 genes, uno de ellos, *ttsI*, está descrito como el activador transcripcional del sistema (Zehner et al, 2008). Para conocer la relevancia del T3SS en la simbiosis *L. mariae-josephae-Bradyrhizobium* sp LmjC se procedió a generar una mutación en el gen *ttsI* y analizar su fenotipo al inocular la planta huésped.

**Figura 1. Sistema de secreción tipo III (T3SS) de la cepa LmjC comparado con el de *B. japonicum* USDA 110. Las regiones más conservadas están sombreadas. Con una flecha se destaca la posición del gen *ttsI* que regula el sistema.**



El fenotipo simbiótico se muestra en la Figura 2 e indica que el mutante *ttsI* es capaz de formar nódulos con *L. mariae-josephae* pero estos son incapaces de fijar nitrógeno como se comprobó por su incapacidad de reducir acetileno, además son blancos a diferencia del color rojizo de los nódulos producidos por la cepa silvestre. También puede constatar que el tamaño, color y porte de la planta inoculada con el mutante son parecidos a los de la planta sin inocular. Por tanto estos resultados indican que el T3SS de LmjC juega un papel importante en el establecimiento de una simbiosis efectiva con su planta huésped.

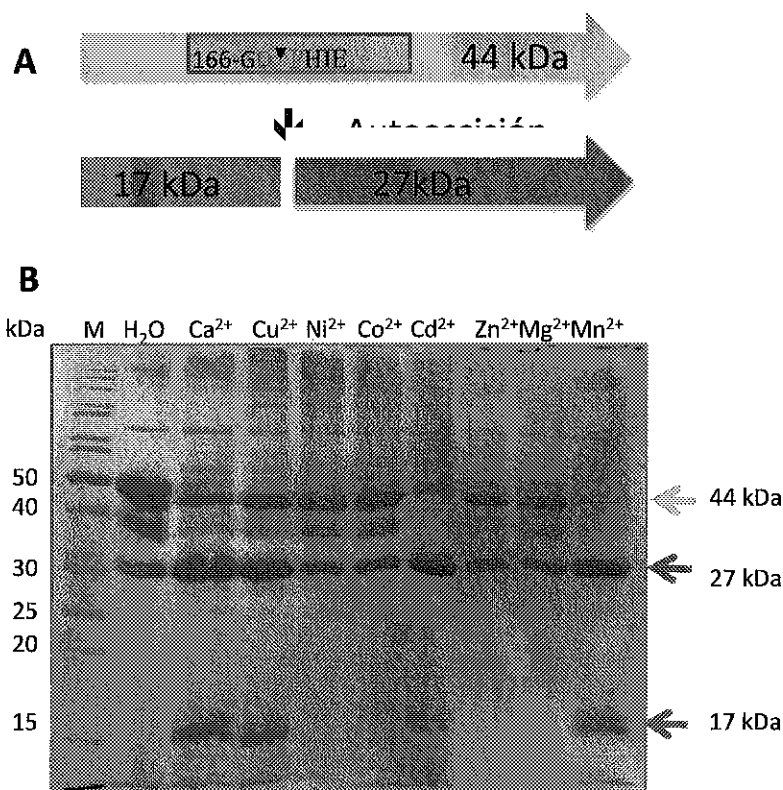
El gen *ttsI* regula el T3SS, este sistema como hemos comentado, es capaz de secretar proteínas llamadas efectores al citoplasma vegetal. Uno de esos posibles efectores está codificado por *nopE* y presenta un motivo autocatalítico (DUF1521) cuyo punto de corte está entre el residuo D<sub>167</sub> y P<sub>168</sub>. La función de esta proteína se desconoce pero nos propusimos estudiar si dicho punto de corte era efectivo para lo que purificamos NopE mediante su expresión con una etiqueta tipo Streptag (Ver Materiales y métodos). Una vez purificada se incubó en presencia de cationes ya que en esas condiciones las proteínas con el motivo DUF1521 se escinden. El resultado se muestra en la Figura 3. Se observó que en presencia de Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup> se produjeron dos fragmentos de los tamaños esperados (17 y 24 kDa). Este efecto no se generó en ausencia de cationes o en presencia de Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>. El papel que esta autocatálisis juega, se desconoce, aunque mutaciones en el motivo catalítico de NopE de *B. japonicum*, impiden que la proteína se escinda y hacen que pierda su función en simbiosis con la leguminosa *Vigna sinensis* (Schirrmeister et al, 2011).



**Figura 2:** Plantas de *Lupinus mariae-josephae* inoculadas con la cepa nativa LmjC de *Bradyrhizobium* sp. (izquierda) y un mutante *ttsL* en el sistema T3SS (centro). Se incluye una planta control sin inocular. Imágenes aumentadas de los nódulos se muestran enmarcadas.

Respecto a algunas características fenotípicas de LmjC, se ha encontrado que esta bacteria es extraordinariamente lenta, su tiempo de generación es superior a 20 horas mientras que el de *B. japonicum* es de 8. Las fuentes de carbono con las que ha mostrado un mejor crecimiento son arabinosa, manitol y fructosa. Otras propiedades se están investigando en estos momentos.

**Figura 3. Estructura y autocatálisis del efector NopE de LmjC. A. Presencia del motivo autocatalítico de NopE y fragmentos que se generarían tras la autoescisión. B. Autoescisión NopE (8 ug) en presencia de diferentes cationes.**



**CONCLUSIONES**



El gen *ttsI* de la cepa LmjC, aislada de *Lupinus mariae-josephae*, forma parte de un sistema de secreción tipo III similar al de *B. japonicum* USDA 110. Una mutación en el gen *ttsI* produce una simbiosis inefectiva con la planta huésped, obteniéndose plantas de pequeño tamaño, amarillentas y con nódulos blancos.

La proteína NopE codificada en la agrupación del T3SS de LmjC se ha purificado y se ha demostrado in vitro que se autoescinde en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  y no en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Esto apunta a que el motivo DUF1521 es funcional.

La cepa LmjC utiliza manitol, arabinosa y fructosa como fuente de carbono y tiene un tiempo de generación superior a 20 horas.

#### AGRADECIMIENTOS

Al profesor Tomás Ruiz Argüeso (Universidad Politécnica de Madrid) por su consejo y sugerencias y a Ana Isabel Bautista por su excelente asistencia técnica. Este trabajo ha sido financiado en parte por la UPM-Actividades con Latinoamérica-México AL12- P(I+D)05.

#### BIBLIOGRAFIA

- Durán et al 2013. Syst Appl Microbiol. 2013 Jan - 2. doi:pii: S0723-2020(12)00159-2. 10.1016/j.syapm.2012.10.008. [Epub ahead of print].
- Krause, A., Doerfel, A. And Göttfert, M. 2002. Mol Plant-Microbe Interact 15:1228-1235
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Pühler, A. 1994 Gene 145: 69-63.
- Schirrmeyer et al, 2011, J. Bacteriol, 193:124-129
- Zehner, S., Schober, G., Wenzel, Lang, K., Goettfert M. 2008. MPMI 21:1087-1093.